

PRODUKSI BIOETANOL MENGGUNAKAN RAGI KOMERSIAL NEW AULE INSTANT DRY YEAST PADA MEDIA MOLASES SECARA FED-BATCH

Fifi Dewi Kadita¹, Jayus², Nurhayati³

Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121, Indonesia
Laboratorium Mikrobiologi
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121, Indonesia
E-mail: kaditadewi@gmail.com

ABSTRAK

Kelangkaan bahan bakar minyak dapat diatasi dengan cara memproduksi energi alternatif, sebagai contohnya yaitu bioetanol. Salah satu usaha untuk meningkatkan produktivitas bioetanol adalah pemilihan sistem fermentasi yang lebih efektif, salah satunya yaitu penggunaan sistem fed-batch. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penggunaan sistem fed-batch dibandingkan dengan sistem batch pada produksi bioetanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* ragi komersial New Aule Instant Dry Yeast pada media molases terhadap produktivitas etanol yang dihasilkan. Penelitian terdiri dari tiga tahap, yaitu preparasi media molases dengan kadar brix 14o dan 24o untuk feeding pada fermentasi fed-batch, preparasi starter dan produksi bioetanol dengan sistem batch dan fed-batch. Parameter analisa meliputi kadar brix, populasi yeast, kadar total gula, kadar gula reduksi, kadar etanol dan kinetika fermentasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sistem fermentasi fed-batch lebih tinggi dibandingkan sistem batch hal ini ditunjukkan dari kadar etanol, produktivitas dan efisiensi fermentasi. Sistem fed-batch memproduksi etanol 61.33 g/L dengan produktivitas 4.73 g/L/jam dan efisiensi fermentasi 45.23%. Sistem batch memproduksi etanol 54.98 g/L dengan produktivitas 4.36 g/L/jam dan efisiensi fermentasi 44.11%.

Kata Kunci: fermentasi fed-batch, fermentasi batch, bioetanol, molases, new aule instant dry yeast

PENDAHULUAN

Kebutuhan energi terutama bahan bakar minyak (BBM) di Indonesia cukup tinggi. Sebagian besar sektor dan kegiatan di Indonesia mengandalkan BBM sebagai sumber energi dalam beraktivitas. Berdasarkan data Ditjen Migas Tahun 2011 konsumsi BBM dalam negeri pada tahun 2011 mencapai 394.052 ribu barel, sedangkan produksi BBM nasional hanya sebesar 238.957 ribu barel. Sehingga hanya sekitar 60% kebutuhan BBM nasional yang dapat dipenuhi dengan produksi nasional, sedangkan sekitar 40% dipenuhi dengan impor. Berdasarkan data dari *International Annual Energy Outlook* (2013), disebutkan bahwa total konsumsi energi dunia tahun 2005-2014 meningkat dari 995,1 juta barel per hari menjadi 1.186,2 juta barel per hari. Konsumsi bahan bakar fosil pada tahun 2011 mencapai hampir 82% dari total konsumsi energi dunia yang merupakan kebutuhan energi primer dunia yang sudah berlangsung selama 25 tahun dan diperkirakan masih akan tetap tetap dominan hingga tahun 2035 (*World Data Bank* dan Dewan Energi Nasional, 2014).

Salah satu upaya untuk mengatasi masalah kekurangan BBM yaitu mencari energi alternatif. Hal tersebut juga disebutkan dalam Peraturan Presiden Nomor 5 Tahun 2006 tentang Kebijakan Energi Nasional untuk mengembangkan sumber energi alternatif. Salah satu sumber energi alternatif yang dapat digunakan adalah bioetanol. Bioetanol merupakan etanol yang dihasilkan dari proses fermentasi biomassa dengan bantuan mikroorganisme (Firdausi et al.,

2013). Bioetanol memiliki beberapa keunggulan diantaranya ketersediaannya dapat diperbaharui dan ramah lingkungan karena memiliki bilangan oktan lebih tinggi (Prihandana et al., 2008).

Molases merupakan salah satu bahan yang dapat digunakan sebagai media produksi bioetanol. Molases memiliki kandungan sukrosa (32%), fruktosa (16%), dan glukosa (14%). Selain itu harga molases murah dan dapat langsung dikonversi menjadi etanol dengan sedikit *pretreatment*. (Hidayat et al., 2006). Ketersediaan molasses sebagai bahan baku bioetanol di Indonesia cukup melimpah, setiap ton tebu diperkirakan dapat menghasilkan 2,7% molases (El-gendy et al., 2013; Mukhtar et al., 2010).

Aktivitas *Saccharomyces cerevisiae* dalam menghasilkan bioetanol akan berbeda apabila kondisi selama fermentasi berbeda. Upaya optimasi kondisi fermentasi diantaranya adalah penggunaan sistem *fed-batch* pada produksi bioetanol. Sistem *fed-batch* mampu meningkatkan produksi bioetanol. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan Caylak dan Vardar (1998), dengan hasil konsentrasi etanol dan *yield* etanol tertinggi yaitu menggunakan proses *fed-batch* masing-masing sebesar 267,76 g/L dan 49,07%. Sedangkan proses *batch* konsentrasi etanol yang dihasilkan 96,71 g/L dengan *yield* 43,96%.

Tujuan penelitian ini yaitu mengetahui pengaruh penggunaan sistem *fed-batch* dibandingkan dengan sistem *batch* pada produksi bioetanol oleh *Saccharomyces*

cerevisiae ragi komersial merk *New Aule Instan Dry Yeast* pada media molases terhadap produktivitas etanol yang dihasilkan. Dan pengaruh pemberian media media baru berupa molases 24obrix pada fermentasi *fed-batch* jam ke-8, 20 dan 32 terhadap produksi bioetanol.

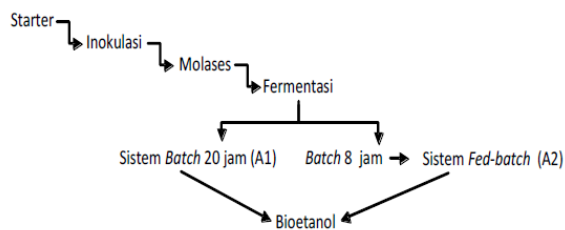
BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan baku yang digunakan meliputi bahan baku, bahan kimia dan kultur mikroorganisme. Bahan baku yang digunakan berupa limbah molases dari PG. Djatiroto. Bahan kimia berupa Diammonium fosfat (NH₄)₂HPO₄, H₂SO₄ 98%, fenol (C₆H₆O) 5%, *reagen dinitrosalisilic acid* DNS, NaOH (PA), Sodium potassium tartrat/*Rochelle salt* (KNaC₄H₄O₆), Sodium dikromat, etanol absolut (C₂H₅OH) dan glukosa absolut. Kultur mikroorganisme yang digunakan yaitu jenis ragi roti instan yaitu merk *New Aule Instan Dry Yeast* dari Xinjiang Shengli Biotechnology Co., Ltd. Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah yaitu fermentor *applicon dependable instrument* kapasitas 2 L (*marine impeller 3 blades*), *Laminar Air Flow* (LAF) CRUMAIR, spektrofotometer Genesys 10 UV, autoklaf Sturdy SA-300VL, inkubator Heraeus Instrument, *hand refractometer* ATAGO, mikroskop, hand pH meter, *haemacytometer* dan alat gelas.

Metode 1

Penelitian dilakukan dengan satu faktor yaitu jenis sistem fermentasi yang digunakan yang dapat dilihat pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Rancangan percobaan produksi bioetanol

1.1 Preparasi Media Fermentasi

Molases murni berderajat brix 80o diencerkan hingga brix 14o untuk fermentasi secara *batch* dengan volume kerja sebanyak 1.5 L molases sedangkan pada fermentasi secara *fed-batch* menggunakan molases dengan brix 14o sebanyak 750 ml molases di awal dan 24o sebanyak 750 ml yang digunakan untuk *feeding* sebanyak 3 kali masing-masing

Alat dan kotak pada *haemacytometer* dapat dilihat pada **Gambar 2** dan **Gambar 3**



Gambar 2. Haemacytometer

250 ml/periode. Keasamaan (pH) molases diturunkan dari pH awal 5,2 menjadi pH 4,5 menggunakan larutan H₂SO₄ pekat dengan konsentrasi 97%. Molases dipanaskan hingga suhu 90°C dan terus didiamkan selama 24 jam yang bertujuan untuk mengendapkan padatan tidak terlarut pada molases. Media molases yang bebas endapan ditambahkan 1 g/L diamonium fosfat yang berfungsi memperkaya nutrisi media fermentasi, kemudian molases disterilisasi pada suhu 121°C dan tekanan 1,72 atm selama 15 menit menggunakan autoklaf.

1.2 Preparasi Starter

Starter dari ragi roti instan dibuat dengan cara menimbang yeast sebanyak 1% (untuk *batch*) dan 2% (untuk *fed-batch*) (w/v) dari jumlah media yang digunakan dalam fermentasi (1500 ml), kemudian yeast dicampur dengan 2% larutan glukosa steril 30 ml pada suhu ±42oC dan didiamkan selama 3 jam di dalam *laminar air flow* sebelum digunakan.

1.3 Fermentasi Bioetanol

Media yang digunakan untuk fermentasi secara *batch* menggunakan volume kerja sebanyak 1.5 L molases dengan kadar brix 14o sedangkan pada fermentasi secara *fed-batch* menggunakan molases dengan kadar brix 14o sebanyak 750 ml molases di awal dan 24o sebanyak 750 ml yang digunakan untuk *feeding* yang telah dipreparasi dan disterilkan. Kemudian ditambahkan yeast sebanyak 1% atau 2% (w/v) dari jumlah medium fermentasi yang digunakan pada masing-masing perlakuan. Fermentasi berlangsung selama 20 jam untuk sistem *batch* dan 48 jam untuk *fed-batch* menggunakan fermentor dengan kecepatan agitasi 200 rpm dan aerasi 1 vvm (selama 6 jam di awal fermentasi) pada suhu ruang ±30oC. Selama fermentasi, dilakukan pengamatan secara periodik setiap 4 jam meliputi populasi yeast, brix, kadar total gula, kadar gula pereduksi, dan kadar etanol.

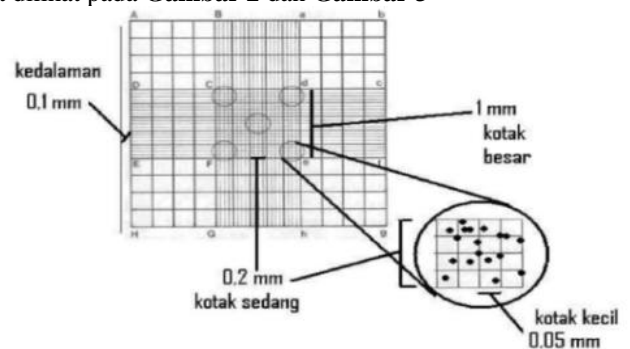
Metode 2

Parameter Pengamatan

a. Populasi *yeast* dengan metode *counting chamber* menggunakan *haemacytometer* (Lay, 1994)

Berikut rumus jumlah sel/ml dalam kotak kecil *haemacytometer*:

$$\frac{\text{Jumlah sel (sel)}}{\text{Volume kotak yang dihitung (ml)} \times \text{jumlah kotak yang dihitung}} \times \text{FF sampel} \times \text{FF metiler}$$



Gambar 3. Kotak Haemacytometer

b. Jumlah total gula dengan metode fenol sulfat (Apriyantono *et al.*, 1989)
 Jumlah total gula (g/L) :

$$\frac{\text{Absorbansi sampel} - c(\text{nilai dari persamaan linear pada kurva standar})}{a} \times \text{FP sampel}$$

Keterangan :

Y=ax+c, kurva standar total gula: y=0,008x-0,003, FP: Faktor pengenceran

c. Kadar gula pereduksi dengan metode dinitrosalisilic acid (DNS) (Miller, 1959)

Jumlah total gula (g/L) :

$$\frac{\text{Absorbansi sampel} - c(\text{nilai dari persamaan linear pada kurva standar})}{a} \times \text{FP sampel}$$

Keterangan :

Y=ax+c, kurva standar total gula: y=0,559x-0,001, FP: Faktor pengenceran

d. Kadar etanol menggunakan metode Chamber Conway (Kartika *et al.*, 1992)

Jumlah total gula (g/L) :

$$\frac{\text{Absorbansi sampel} - c(\text{nilai dari persamaan linear pada kurva standar})}{a} \times \text{FP sampel} \times \text{BJ Etanol}$$

Keterangan :

Y=ax+c, kurva standar total gula: y=59,89x+0,005, FP: Faktor pengenceran, BJ etanol (berat jenis)= 0.789 g/mL

e. Kinetika Fermentasi

1. Produktivitas etanol (g/L/jam) =

$$\frac{\text{Etanol yang dihasilkan } (\frac{g}{L})}{\text{Lama fermentasi (jam)}}$$

2. Growth rate =

$$\frac{\ln \text{ populasi jam ke } n - \ln \text{ populasi jam ke } -0}{\Delta t}$$

3. Laju konsumsi gula pereduksi (g/L/jam) =

$$\frac{\Delta S (\frac{g}{L})}{\text{Lama fermentasi (jam)}}$$

4. growth yield =

$$\frac{\Delta X (\log \frac{sel}{ml})}{\Delta S (\frac{g}{L})}$$

5. Efisiensi fermentasi (%) =

$$\frac{\text{Etanol yang dihasilkan } (\frac{g}{L})}{\text{Etanol teoritis } (\frac{g}{L})} \times 100\%$$

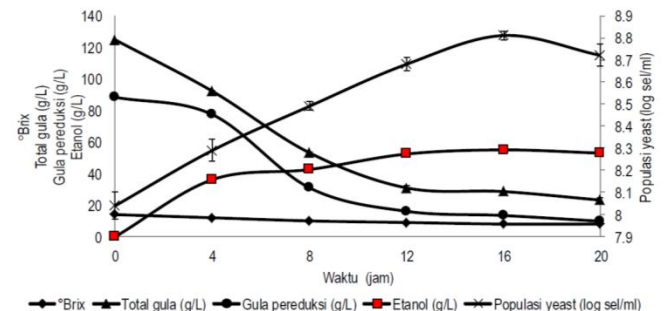
HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Profil Fermentasi Bioetanol secara Batch dan Fed-Batch

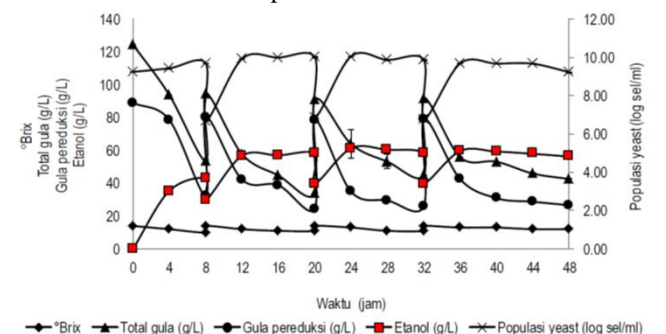
Yeast pada fermentasi bioetanol secara *batch* maupun *fed-batch* tumbuh dan berkembangbiak selama fermentasi yang ditandai dengan adanya peningkatan jumlah populasi hingga kurun waktu tertentu. Yeast pada fermentasi bioetanol secara *batch* berada pada fase logaritmik (fase pertumbuhan sel hingga mencapai jumlah maksimum) selama 16 jam fermentasi, sedangkan pada fermentasi secara *fed-batch* berada pada fase logaritmik 24 jam fermentasi. Jumlah populasi maksimum pada fermentasi secara *fed-batch* dengan pemberian tambahan media baru 24obrix pada fermentasi jam ke-8, 20 dan 32 sebanyak 250 ml molases dicapai lebih lama (pada 24 jam fermentasi)

dibandingkan dengan fermentasi secara *batch* (tanpa penambahan media baru) yaitu 16 jam. Jumlah populasi maksimum fermentasi secara *fed-batch* memiliki nilai lebih tinggi dibandingkan dengan fermentasi secara *batch*, masing- masing sebesar 10,06 log sel/ml dan 10,01 log sel/ml. Pada fermentasi *batch*, polulasi yeast mengalami penurunan dari 10,01 log sel/ml hingga mencapai 9,93 log sel/ml setelah 16 jam fermentasi. Sedangkan pada fermentasi *fed-batch*, jumlah populasi yeast masih mengalami peningkatan dari 10,00 log sel/ml hingga 10,02 log sel/ml. Setelah itu mulai mengalami penurunan setelah fermentasi 24 jam. Hal ini terjadi karena pada fermentasi secara *fed-batch* dilakukan penambahan substrat ketika konsentrasi gula pada media fermentasi mulai menurun sehingga kebutuhan sumber karbon bagi yeast dapat dipenuhi untuk melakukan pertumbuhan dan perkembangan hingga kurun waktu tertentu.

Etanol maksimum yang dihasilkan pada fermentasi secara *fed-batch* lebih tinggi dibanding *batch* yakni 61.33 ± 0.40 g/L sedangkan *batch* menghasilkan 54.98 ± 0.33 g/L. Menurut Suwasono, dkk. (2002), berdasarkan perbandingan produk dan pertumbuhan sel, fermentasi alkohol termasuk tipe fermentasi pertumbuhan terpadu (*associated growth*), yaitu suatu proses dengan pertumbuhan sel dan pembentukan produk berjalan seiring. Profil produksi bioetanol secara *batch* dan *fed-batch* dapat dilihat pada Gambar 4 dan Gambar 5.



Gambar 4. Hubungan peningkatan jumlah populasi (log sel/ml) dan konsentrasi etanol (g/L) dengan penurunan kadar total gula (g/L), gula pereduksi (g/L) dan obrix selama fermentasi secara *batch* pada media molases



Gambar 5. Hubungan peningkatan jumlah populasi (log sel/ml) dan konsentrasi etanol (g/L) dengan penurunan kadar total gula (g/L), gula pereduksi (g/L) dan obrix selama fermentasi secara *fed-batch* pada media molases

Kinetika Fermentasi Bioetanol secara *Batch* dan *Fed-Batch*

Kinetika fermentasi yang diamati pada produksi bioetanol secara *batch* dan *fed-batch* meliputi laju konsumsi gula pereduksi, *growth rate*, *growth yield*, produktivitas etanol dan efisiensi fermentasi. Nilai dari setiap parameter kinetika yang diamati merupakan hasil rata-rata selama fermentasi. Kinetika fermentasi pada produksi bioetanol secara *batch* dan *fed-batch* dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Parameter	Jenis fermentasi	
	Batch	Fed-Batch
Laju konsumsi gula pereduksi (g/L /jam)	5.17	6.43
Growth rate/jam	0.1	0.07
Growth yield (log sel/ml/g/L)	0.007	0.004
Etanol (g/L)	54.98	61.33
Produktivitas etanol (g/L/jam)	4.36	4.73
Efisiensi fermentasi (%)	44.11	45.23

Tabel 1. Kinetika fermentasi pada produksi bioetanol secara *batch* dan *fed-batch*

1. Laju konsumsi gula pereduksi

Nilai laju konsumsi gula pereduksi diperoleh dari perbandingan antara jumlah gula pereduksi yang dikonsumsi selama fermentasi dengan lama fermentasi yang berlangsung. Laju konsumsi gula pereduksi pada fase logaritmik atau eksponensial pada fermentasi secara *batch* dan *fed-batch* secara berturut-turut sebesar 5.17 g/L supernatan/jam dan 6.43 g/L supernatan/jam.

2. Growth rate

Nilai *growth rate* merupakan representasi dari rata-rata laju pertumbuhan semua sel mikroba yang ada dalam media, namun tidak menunjukkan laju pertumbuhan maksimum dari masing-masing sel mikroba karena laju pertumbuhan yang ditunjukkan merupakan laju pertumbuhan saat mikroba mencapai fase log (Lee, 2006). Nilai *growth rate* pada fase log atau eksponensial pada fermentasi *batch* dan *fed-batch* yaitu masing-masing 0.10/jam dan 0.07/jam. Nilai *growth rate* masing-masing sistem fermentasi tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan substrat pada fermentasi secara *fed-batch* tidak memberikan pengaruh berarti terhadap laju pertumbuhan yeast, walaupun masih dapat meningkatkan jumlah populasi yeast maksimum hingga 24 jam fermentasi.

3. Growth yield

Growth yield merupakan suatu cara untuk menyatakan kebutuhan nutrisi oleh suatu mikroba secara kuantitatif. Nilai *growth yield* diperoleh dari perbandingan kenaikan jumlah mikroba terhadap jumlah substrat yang digunakan oleh mikroba. (Stanburry dan Whitaker, 1990). Panikov (2014) menyatakan juga bahwa nilai *growth yield* menunjukkan secara jelas kebutuhan nutrisi bagi pertumbuhan sel mikroorganisme secara kuantitatif: berapa banyak satuan massa dari substrat yang harus dikonsumsi agar dapat dihasilkan satu satuan massa dari sel mikroorganisme. Nilai *growth yield* pada fermentasi secara

batch dan *fed-batch* yaitu 0.007 dan 0.004 log sel/ml/g/L supernatan. Hal ini menunjukkan bahwa perbandingan kenaikan populasi yeast terhadap substrat yang digunakan pada fermentasi secara *fed-batch* lebih rendah dibandingkan fermentasi secara *batch*. Hal tersebut dapat terjadi karena pada fermentasi secara *fed-batch* terdapat penambahan media baru sehingga berpengaruh pada hasil perbandingan antara peningkatan jumlah populasi yeast dengan gula.

4. Produktivitas etanol

Produktivitas etanol merupakan perbandingan antara konsentrasi etanol yang dihasilkan dengan lama waktu fermentasi. Produktivitas etanol menunjukkan laju produksi etanol oleh mikroba yang dihasilkan tiap satuan waktu. Penentuan produktivitas etanol dari kedua sistem fermentasi dilakukan pada fase log atau eksponensial fermentasi. Produktivitas etanol pada *fed-batch* yakni 4.73 g/L/jam sedangkan *batch* 4.36 g/L/jam. Hal ini dikarenakan substrat baru yang ditambahkan pada fermentasi *fed-batch* digunakan oleh yeast untuk pertumbuhan sel maupun memproduksi enzim alkohol dehidrogenase yang dapat mengkonversi glukosa menjadi etanol, sehingga produktivitasnya meningkat.

5. Efisiensi fermentasi

Nilai efisiensi fermentasi diperoleh dari perbandingan antara konsentrasi etanol yang dihasilkan dengan konsentrasi etanol teoritis yang kemudian dikalikan dengan seratus persen. Konsentrasi etanol teoritis diketahui berdasarkan reaksi stoikiometri fermentasi alkohol, dimana 1 mol glukosa akan menghasilkan 2 mol etanol. Pada umumnya, setiap 100 g glukosa yang digunakan dapat menghasilkan etanol sebanyak 45-49 g etanol dengan batas etanol teoritis yang dapat dihasilkan sebanyak 51,1 g (Patrascu *et.al*, 2009). Hal ini juga disebutkan oleh Kent (2013) yang menyatakan bahwa metabolik *yield* maksimum dari kedua heksosa dan pentosa adalah 0.51 gram etanol per gram gula yang digunakan (Kent, 2013).

Efisiensi fermentasi yang dihitung pada saat fase log atau eksponensial (12 jam fermentasi) pada fermentasi *batch* sebesar 44.11% sedangkan fermentasi *fed-batch* 45.23%. Hal ini menunjukkan bahwa nilai efisiensi fermentasi secara *fed-batch* lebih tinggi dibandingkan secara *batch*. Hal tersebut dikarenakan adanya penambahan substrat pada fermentasi secara *fed-batch* menyebabkan *yield* etanol yang dihasilkan meningkat sehingga efisiensi fermentasinya pun juga meningkat.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan konsentrasi etanol maksimum yang dihasilkan pada fermentasi secara *fed-batch* lebih tinggi dibandingkan pada fermentasi secara *batch* berturut-turut sebesar 61.33 g/L dan 56.78 g/L. Serta Pemberian media baru dengan konsentrasi 24obrix pada jam ke-8, 20 dan 32 pada fermentasi secara *fed-batch* mampu meningkatkan konsentrasi etanol maksimum yaitu sebesar 4.55 g/L dari konsentrasi etanol yang dihasilkan pada fermentasi secara *batch*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini terlaksana atas dana Hibah DP2M (Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat)

DIKTI tahun 2014 dan bantuan dari Departemen Bioteknologi Fakultas Agro-Industri Universitas Kasetsart, Thailand.

DAFTAR PUSTAKA

- Aprianto, Fardiaz, Puspitasari, Sedarnawati dan Budiyanto. 1989. *Analisa Pangan*. Bogor: IPB Press.
- Bailey, James E. and David F. Ollis, 1986. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2nd edition. McGraw-Hill Book Co. Singapore.
- Bisson, L. 2001. *The Alcoholic Fermentation*. Davis: University of California.
- Dake, M.S., Amarapurkar, S.V., Salunkha, M.L., dan Kamble, S.R. 2010. *Production of Alcohol by Saccharomyces sp. Using Natural Carbohydrate Sources*. *Advance Biotech Vol. 10 (06): 37-41*.
- Caylak, B. dan F. Vardar-Sukan. 1998. *Comparison of Different Production Processes for Bioethanol*. *Turk.J.Chem. 22* : 351-359.
- Cheng, Ngoh G., Masitah Hasan, Andri C. K., Chew F. L. dan Tham, Margaret. 2009. *Production of Ethanol by Fed- batch Fermentation*. *Pertanika J. Sci. & Technol. 17 (2): 399-408*. Universiti Putra Malaysia Press.
- Desroisier. 1989. *Teknologi Pengawetan Pangan*. Penerjemah M. Muljoharjo. Jakarta: UI-Press.
- El-Gendy, N.S., Madian, H.R. dan Abu-Amr, S.S. 2013. *Design and Optimization of a Process for Sugarcane Molasses Fermentation by Saccharomyces cerevisiae Using Response Surface Methodology*. *International Journal of Microbiology. Vol. 2013. Article ID 815631: 1-9*.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan I*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Fauzi, M. 2009. *Production of Bioethanol from Tapioca Starch Using Saccharomyces cerevisiae : Effects of Temperature and Agitation Speed*. Tesis. Pahang : Faculty of chemical and Natural Resources Engineering, University of Pahang Malaysia.
- Hidayat, N., Padaga, M.C., dan Suhartini, S. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Yogyakarta: Andi offset.
- International Annual Energy Outlook. 2013. *World Total Energy Consumption by Region and Fuel*. Online. DOE/EIA-0383(2013).
- Jeffries, T.W. dan Jin, Y.S. 2000. *Ethanol and Thermotolerance in The Bioconversion of Xylose by Yeast*. *Adv. Appl. Microbiology. 47: 221-268*.
- Judoamidjojo, M., Said, E. G., dan Darwis, A. A. 1992. *Teknologi Fermentasi*. Jakarta: Rajawali Press.
- Kartika, B., A.D., Guritno, D., Purwadi, & Ismoyowati. 1992. *Petunjuk Evaluasi Produk Industri Hasil Pertanian*. Yogyakarta: PAU Pangan dan Gizi UGM.
- Kuhad, Ramesh C., Girija, M., Rishi, G. dan Krishna, K. S. 2010. *Fed-batch Enzymatic Saccharification of Newspaper Cellulosics Improves The Sugar Content in The Hydrolysates and Eventually The Ethanol Fermentation by Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy 1189- 1194*. Universiti of Delhi South Campus.
- Lin, T. dan Tanaka, S. 2006. *Ethanol Fermentation From Biomass Resources: Current Status And Prospects*. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol.69:627-642*.
- Miller, G.L. 1959. *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent For Determination of Reducing Sugar*. *Anal Chem. Vol. (31): 426-428*.
- Mukhtar, K., Asgher, M., Afghan, S., Hussain, K., dan Zia-ul-Hussain, S. 2010. *Comparative Study on Two Commercial Strains of Saccharomyces cerevisiae for Optimum Ethanol Production on Industrial Scale*. *Journal of Biomedicine and Bioechnology Vol. 7 (05): 12-17*.
- Nurrohm, A. 2014. *Perlu Terobosan Kebijakan untuk Pencapaian Target Pemakaian Bahan Bakar Nabati*. *IPTEK untuk Indonesia Sejahtera, Berdaulat & Bermartabat : Bunga Rampai Pemikiran Anggota Dewan Riset Nasional 2014*. Jakarta: Dewan Riset Nasional.
- Prihandana, R., Noerwijati, K., Adinurani, P.G., Setyaningsih, D., Setiadi, S., dan Hendroko, R. 2008. *Bioetanol Ubi Kayu Bahan Bakar Masa Depan*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Patrascu, E., Rapeanu, G., Bonciu, C., Vicol, C., dan Bahrim. 2009. *Investigation of Yeast Performances in The Fermentation of Beet and Cane Molasses to Ethanol Production*. *Ovidius University Press, 20 (2):202-203*.
- Prihandana, R., Noerwijati, K., Adinurani, P.G., Setyaningsih, D., Setiadi, S., dan Hendroko, R. 2008. *Bioetanol Ubi Kayu Bahan Bakar Masa Depan*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Sadik, M.W. dan Halema, A.A. 2014. *Production of Ethanol from Molasses and Whey Permeate using Yeasts and Bacterial Strains*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences Volume 3 Number 3: 804-818*.
- Satyanarayana, T., Johri, B.I., dan Prakash, A. 2012. *Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*. Springer Science and Business Media.
- Smith, P.G. 2007. *Application of Fluidization to Food Processing*. Oxford: Blackwell Publishing Company.
- Sener, A., Chambas, A., dan Onal, O. 2007. *Effect of Fermentation Temperature of Kinetic Growth Saccharomyces cerevisiae*. University of Cukurova Faculty of Agriculture, Department of Food Engineering, Balcali, Adana-Turkey.
- Suwasono, S., Fauzi, M., Lindriati, T. 2002. *Teknologi Fermentasi*. Jember: Fakultas Teknologi Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Jember.
- Widjaja, Tri., Hariani, Natalia., Gunawan, Setio, dan Darmawan, R., 2010. *Teknologi Immobilisasi Sel Ca-Alginat untuk Memproduksi Etanol secara Fermentasi Kontinyu dengan Zymomonas Mobilis Termutasi*. Jurusan Teknik Kimia ITS.